

Metabolitos secundarios y cianotoxinas producidos por cianobacterias del lago de Atitlán.

Secondary metabolites and cyanotoxins produced by cyanobacteria from lake Atitlán

Edwin Axpuaca-Aspuac, Erick Estrada-Palencia, Balmore Valladares-Jovel, Bessie Oliva-Hernández, Elisandra Hernández-Hernández, Francisco Pérez-Sabino
Escuela de Química, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia,
Universidad de San Carlos de Guatemala (USAC).
fpsabino@usac.edu.gt

Recibido: 10 de febrero 2016 Aceptado: 21 de agosto 2017

Resumen

Desde 2008 han ocurrido florecimientos extensivos de cianobacterias en el lago de Atitlán, Guatemala, principalmente de la especie *Limnographis robusta* (Parakutty), como consecuencia del incremento de los niveles de contaminación y de variaciones climáticas en la cuenca, desconociéndose si las cianobacterias del lago eran capaces de producir toxinas y otros metabolitos secundarios que pudieran ser beneficiosos. En el presente trabajo se investigaron los metabolitos secundarios producidos por *L. robusta*, aislada y cultivada en el laboratorio, así como cianotoxinas en biomasa de fitoplancton colectada en tres sitios en el lago de Atitlán. Para el análisis de cianotoxinas, se realizaron colectas de biomasa de fitoplancton, por arrastre de red de fitoplancton, en tres sitios en el lago de Atitlán, en tres muestreos realizados entre 2011 y 2012. Las cianotoxinas fueron analizadas por cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas (LC/MS), habiéndose encontrado microcistina-LR en dos muestras (una en concentración no cuantificable y la otra de 20.1 ng/g de biomasa seca), colectadas en octubre de 2012, en las cuales *L. robusta* era la especie fitoplanctónica dominante. Se obtuvieron resultados positivos para flavonoides, saponinas y antraquinonas, no encontrándose presencia de alcaloides. Las bajas concentraciones de microcistina-LR encontrados en la biomasa colectada en el lago no suponen riesgo para la población humana, pero se comprobó que las cianobacterias del lago de Atitlán son capaces de producir microcistinas. Los resultados positivos para saponinas, flavonoides y antraquinonas en *L. robusta*, son prometedores para la búsqueda de metabolitos con actividad biológica con posibles aplicaciones en la biotecnología.

Palabras clave: floraciones de cianobacterias, *Limnographis robusta*, Microcistina-LR.

Abstract

Extensive cyanobacterial blooms have occurred in Atitlan lake since 2008, being *Limnoraphis robusta* (Parakutty) the most abundant species recorded. It is generally accepted that these blooms are caused by the rising levels of pollution and climatic variations in the basin. However, it was unknown if the lake cyanobacteria were capable of producing toxins or beneficial secondary metabolites. Four groups of secondary metabolites were investigated in *L. robusta*, which was isolated and cultivated in the laboratory. Cyanotoxins were analyzed from phytoplankton biomass collected in lake Atitlan. Biomass samples were collected with the aid of a phytoplankton net in three different sites of the lake surface. This was carried out during three field trips conducted between 2011 and 2012. Cyanotoxins were analyzed by liquid chromatography coupled to mass spectrometry (LC/MS). Microcystin-LR was found in low concentrations in two biomass samples collected in October 2012 (one in a non-quantifiable concentration and the other of 20.1 ng / g of dry biomass). *L. robusta* was the dominant phytoplanktonic species. Positive results were obtained for the tests of flavonoids, saponins and anthraquinones through phytochemical tests performed on the extracts of the biomass cultivated in the laboratory. Alkaloids were not found.

The low concentration levels of microcystin-LR found in the biomass collected in the lake surface do not pose a risk to the local human population. Nevertheless, it was proven that cyanobacteria in Atitlan lake are capable of producing microcystins-LR. The positive results, regarding the presence of saponins, flavonoids and anthraquinones in *L. robusta*, are promising for the quest of metabolites with biological activity and possible applications in biotechnology.

Keywords: cyanobacterial blooms, *Limnoraphis robusta*, Microcystin-LR.

Introducción

La calidad ambiental del lago de Atitlán se ha visto deteriorada en los últimos años en forma drástica, debido a las actividades humanas desarrolladas sin las medidas de mitigación necesarias para la conservación del entorno, provocando en conjunto con factores climáticos, la floración extensiva de cianobacterias. A partir de 1983 se comenzaron a observar notorios incrementos en las concentraciones de fitoplancton, con respecto a estudios efectuados en 1968 y 1976 por La Bastille (1988). En un estudio realizado en 2009 por la Escuela de Química de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, se encontraron concentraciones de nitrógeno superiores a 0.5 mg/L y de fósforo superiores a

0.1 mg/L en varios puntos en el lago de Atitlán, sobre todo en los sitios ubicados en las cercanías de las principales poblaciones como Santiago Atitlán, Panajachel, San Lucas Tolimán y Santa Catarina Palopó (Oliva et al., 2010). En otro estudio más reciente, se encontraron en el lago de Atitlán, concentraciones de arsénico hasta de 29.7 µg/L y de mercurio hasta de 8.2 µg/L (Pérez-Sabino et al., 2015), siendo superiores a los límites máximos permisibles de 10 µg/L para arsénico y 1 µg/L para mercurio, según la Norma Guatemalteca para Agua Potable NGO 29001:99. Se considera que el incremento en los niveles de nutrientes ha contribuido a los florecimientos de cianobacterias que se han observado desde 2008 en el lago de Atitlán. La cianobacteria *L. robusta* inicialmente identificada como *Lyngbya* sp. ha sido la

especie más abundante en estos florecimientos. Además de Guatemala esta cianobacteria se ha encontrado en lagos en California (Estado Unidos), India, África y Brasil (Komarek et al., 2013; Rejmankova, Komarek, Dix, Komarkova, & Girón, 2011).

Las cianobacterias son una rica fuente de nuevos metabolitos secundarios, presentando una diversidad química bien representada por el género *Lyngbya* (especialmente *L. majuscula*), la cual es una fuente prolífica de amidas de ácidos grasos halogenados y no halogenados, lipopéptidos y péptidos ribosomales, muchos de los cuales poseen una bioactividad significativa contra una serie de células blancas (Jiménez et al., 2009). Se han aislado citotoxinas de *Lyngbya* sp. las cuales muestran citotoxicidad contra líneas celulares de cáncer. Sin embargo, para estos compuestos no se ha demostrado que presenten toxicidad para los organismos acuáticos, incluyendo camarón y peces (Smith, Boyer, & Zimba, 2008).

Existen diferentes tipos de toxinas las cuales provienen de diferentes géneros de cianobacterias. Por ejemplo, las dermatoxinas debromoaplysiatoxina y la lyngbyatoxina, son producidas por *Lyngbya* sp. y la aplysiatoxina es producida tanto por el género *Lyngbya* como por *Oscillatoria*. La *L. majuscula* produce la toxina lyngbyatoxina A (LA) y la debromoaplysiatoxina (DAT) las cuales producen efectos irritantes. Se han evaluado los efectos irritantes de los productos químicos encontrados en *L. majuscula*, por medio de ensayos de hinchazón en orejas de ratones (Osborne, Seawright, & Shaw, 2008).

En cuanto a la degradación de microcistinas de cianobacterias, la ozonización de la *Microcystis aeruginosa*, ha sido eficaz para la eliminación de microcistinas (Hengfeng & Tao, 2009). En Brasil Ferrão-Filho,

Soares, Freitas Magalhães y Azevedo (2009) estudiaron el potencial del uso de cladóceros (suborden de crustáceos) como bioindicadores en el biomonitoreo de cianotoxinas. En el estudio se encontró que las cianobacterias fueron el grupo dominante en dos embalses de agua dulce, siendo los principales géneros: *Anabaena*, *Cylindrospermopsis* y *Microcystis*, observándose en los bioindicadores, muerte, parálisis y disminución en el crecimiento de la población. También en Brasil, en 2004 se observó una floración de cianobacterias en el embalse Monjolinho del estado de Sao Paulo, siendo las principales especies de fitoplancton detectadas, *Anabaena circinalis* y *A. spiroides*. Los extractos crudos de la cianobacteria fueron tóxicos para cladóceros y ratones (Sotero-Santos, Garcia Carvalho, Dellamano-Oliveira, & Rocha, 2008).

El estudio de las cianobacterias ha ganado mucho la atención en años recientes, debido a su potencial aplicación en la industria de la biotecnología. Se han identificado como fuentes ricas en compuestos activos biológicamente como antivirales, antibacterianos y anticancerígenos (Abed, Dobretsov, & Sudesh, 2008). Recientemente se ha descubierto que bacterias organotróficas aeróbicas asociadas a las cianobacterias son capaces de degradar componentes del petróleo, plaguicidas y surfactantes, pudiendo estas asociaciones ser utilizadas en la biorremediación de estos compuestos en sitios contaminados y aguas residuales (Abed et al., 2008).

El propósito del presente trabajo fue determinar si la biomasa de cianobacterias en el lago de Atitlán, produce cianotoxinas que puedan poner en riesgo la salud humana, así como explorar la producción de metabolitos secundarios por parte de la cianobacteria *L. robusta*, que ha sido la más abundante en las floraciones ocurridas en el lago de Atitlán desde 2008.

Materiales y métodos

Tipo de estudio

La presente investigación es de carácter exploratorio, al desconocerse el comportamiento y producción de metabolitos secundarios de la cianobacteria *L. robusta*, mayoritaria en los florecimientos fitoplanctónicos observados en el lago de Atitlán desde 2008, supeditándose la colecta de muestras de biomasa fitoplanctónica a los períodos en que se produjeran mayores volúmenes de biomasa en el lago de Atitlán entre 2011 y 2012.

Recolección de muestras

Los sitios de muestreo de biomasa de fitoplancton se seleccionaron por conveniencia, en el sitio

ubicado en el centro del lago de Atitlán, donde se colectan muestras para monitoreo de la calidad del agua, ya que es un sitio donde se concentra la biomasa por las corrientes arremolinadas del lago, en Jaibalito en la parte noroeste del lago, sitio donde también se realizan muestreos para monitoreo de la calidad del agua, y en la bahía de Santiago Atitlán (figura 1), que ha presentado diferencias con el resto del lago, en cuanto a composición fitoplanctónica, al presentar mayor concentración de organismos de *Microcystis* sp. o *Aphanizomenon* sp. en conteos de fitoplancton no publicados realizados previamente por los autores de este trabajo.

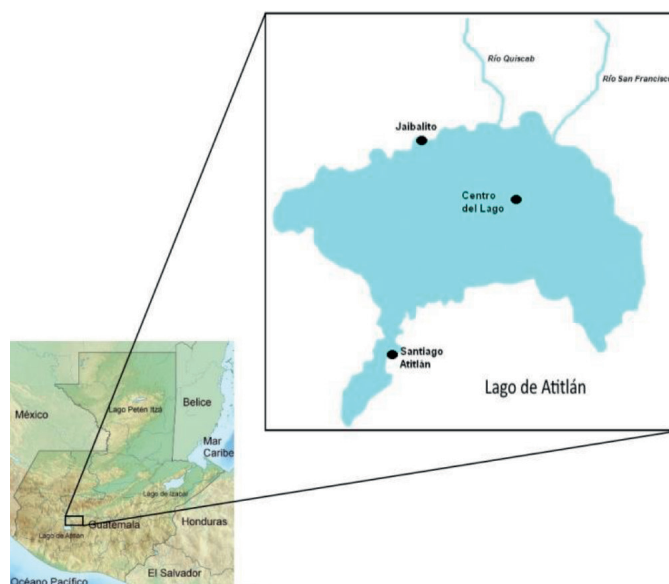


Figura 1. Mapa de sitios de muestreo de biomasa de *L. robusta* en el lago de Atitlán.

Siete muestras de biomasa fitoplanctónica fueron colectadas por arrastre con red de fitoplancton (figura 2), por un tiempo promedio de 40 min correspondiendo a aproximadamente 400 m³ de agua cada muestra, en agosto de

2011, enero de 2012 y octubre de 2012 (tabla 1). Previo a su traslado, el volumen de las muestras fue reducido a 100 mL eliminando agua a través de la red, aplicado presión manual al recipiente (figura 3). En Jaibalito se colectó solamente

una muestra en octubre de 2012. Las muestras fueron almacenadas en recipientes plásticos de microbiología de 100 mL y congeladas hasta su procesamiento en el laboratorio.

Para el aislamiento de la cianobacteria *L. robusta*, se colectaron muestras de fitoplancton en los sitios de monitoreo de calidad del agua ubicados en Santiago Atitlán, San Pedro la Laguna, Bahía San Buenaventura, frente al río San Francisco en Panajachel y frente al río Quiscab, en octubre de 2012. Las muestras fueron colectadas haciendo pasar 100 L de agua por red de fitoplancton, reduciéndose el volumen a 100 mL. A partir de las muestras de 100 mL se tomaron alícuotas de 1 mL las cuales fueron almacenadas en tubos de ensayo, transportadas en hieleras a 4°C y posteriormente utilizadas para el aislamiento y cultivo de la cianobacteria.



Figura 2. Muestreo de biomasa de fitoplancton por arrastre de red en el lago de Atitlán.

Tabla 1. Sitios de muestreo de fitoplancton en el lago de Atitlán

Lugar	Latitud N	Longitud W	Meses de colecta
Centro del lago	14°42'32.2"	91°10'29.5"	Agosto 2011, enero 2012 y octubre 2012
Santiago Atitlán	14°38'34.6"	91°13'55.5"	Agosto 2011, enero 2012 y octubre 2012
Jaibalito	14°44'04.3"	91°13'09.1"	Octubre 2012



Figura 3. Concentración por presión manual de la biomasa colectada a partir del arrastre de red de fitoplancton.

Determinación cianotoxinas de la cianobacteria *L. robusta*.

Los análisis de cianotoxinas de los grupos de microcistinas, saxitoxinas y cilindrospermopsinas fueron realizados en el Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho de la Universidad Federal de Río de Janeiro (UFRJ), Brasil. Primeramente, las muestras de biomasa de fitoplancton fueron liofilizadas hasta sequedad total. Para el análisis de microcistinas, se extrajeron 0.2 g de biomasa seca con metanol:butanol:agua en proporciones 20:5:75 (v/v), se agitó la suspensión por 1 h y luego se centrifugó. Se guardó el sobrenadante y se repitió esta etapa dos veces. Se evaporaron los sobrenadantes hasta 1/3 del volumen inicial. El extracto se pasó por cartuchos de octadecil-silano ODS (C-18) de EFS, previamente activados con 20 mL de metanol 100% y 20 mL de agua. Se eluyó

con 20 mL de agua, 20 mL de metanol al 20% y 20 mL de metanol 100%, respectivamente. Se evaporó la fracción de metanol al 100% y se resuspendió en 1.0 ml de metanol al 50%. Se dejó en reposo por 1 h. Esta suspensión se filtró en filtro de nylon de 0.45 mm (Krishnamurthy, Carmichael, & Sarver, 1986). Luego, las muestras se analizaron por Cromatografía de Líquidos acoplada a Espectrometría de Masas (LC/MS) utilizando una columna Altima C18 de 150 x 4.6 mm. Las saxitoxinas y cilindrospermopsinas fueron analizadas en las muestras colectadas en 2011, por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (HPLC) con detectores de fluorescencia (Oshima, 1995) y de arreglo de diodos (Molica et al., 2002), respectivamente, no habiendo sido detectadas en ninguna muestra.

Aislamiento, cultivo y determinación de metabolitos secundarios de *L. robusta*.

Se trasladó 1 mL de la muestra no congelada de fitoplancton, a un tubo de ensayo de 25 mL, el cual contenía 15 mL de caldo nutritivo (medio Combo acuoso). 1 mL del material contenido en el tubo se trasladó a otro tubo de ensayo de 25 mL, el cual contenía 15 mL del caldo nutritivo (medio Combo). Estos tubos fueron sujetos a micro-manipulación con tubos capilares bajo el microscopio. El cultivo se basó en la metodología de Harrison y Berges (2005), en la cual para las fases *in vitro*, se utilizó el medio de cultivo Combo. Se instalaron estanterías que se equiparon con iluminación artificial (tubos fluorescentes de 40 W, luz de día, 6,500 K) superior y posterior, así también se instalaron bombas de acuario para proveer aireación. La iluminación y aireación estuvieron controladas por un temporizador, con un fotoperiodo de 4 h, para un total de tres fotoperiodos en 24 h, alternos con tres períodos de descanso. La biomasa obtenida fue esparcida sobre cedazo fino, filtrada al vacío y secada en un horno a una

temperatura de 85 °C. La cantidad de biomasa seca obtenida fue de aproximadamente de 2 g, la cual se utilizó para realizar el tamizaje fitoquímico.

Tamizaje fitoquímico

Las pruebas de tamizaje fitoquímico para flavonoides, antraquinonas, saponinas y alcaloides se realizaron por cromatografía en capa fina de acuerdo con el Manual de operaciones. Tamizaje fitoquímico del laboratorio de investigación de productos naturales (Laboratorio de investigación de productos naturales [Lipronat], 2005) de la Facultad, habiéndose realizado los análisis en dicho laboratorio. Para cada compuesto revelado positivamente en las cromatografías en capa fina, se determinaron los valores de R_f.

Una masa de 0.5 g de biomasa seca de *L. robusta* fue utilizada para cada prueba, identificándose la pertenencia de los compuestos a las familias de productos naturales luego de corrida la cromatografía en capa fina, por la coloración característica de acuerdo con el revelador empleado, comparándose la coloración con un estándar de cada grupo de compuestos, como sigue: para flavonoides, se utilizó el revelador NP/PEG, obteniéndose manchas de coloraciones amarilla, azul o verde ante la presencia positiva al exponerse a luz UV de 365 nm. Para comparación fueron utilizados estándares de rutina, ácido clorogénico y quercetina.

Para antraquinonas, se utilizó como revelador una solución etanólica de hidróxido de potasio al 10%, obteniéndose manchas de coloración amarilla al exponerse a luz UV de 365 nm. Para comparación se utilizó un estándar de antrona.

Para saponinas se utilizó como revelador vainillina-ácido sulfúrico, obteniéndose manchas de coloración violeta, café-rojo o azul-verde

ante presencia positiva, al exponerse a luz visible. Para comparación se utilizó estándar de diosgenina.

Para alcaloides se utilizó como revelador el reactivo de Dragendorff, obteniéndose manchas de color café o naranja ante presencia positiva, al exponerse a la luz visible. Como estándares de comparación se utilizaron papaverina y quinidina.

Resultados

Se encontró la cianotoxina microcistina-LR (figura 4) en biomasa seca de las muestras colectadas en octubre de 2012, en Jaibalito (20.9 ng/g) y en el centro del lago de Atitlán (no cuantificable).

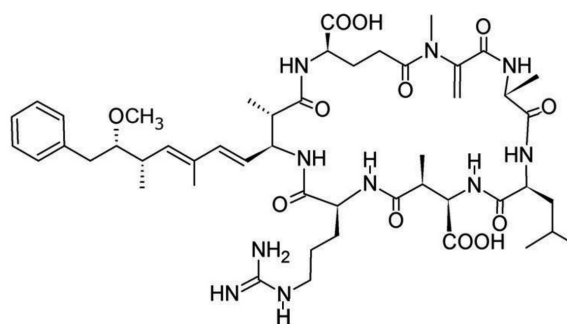


Figura 4. Estructura de la microcistina-LR.

En la figura 5 se presenta un cromatograma obtenido por LC/MS de una de las muestras en que se detectó la microcistina-LR. No se detectaron saxitoxinas ni cilindrospermopsinas en ninguna muestra. En las muestras colectadas en agosto de 2011 y enero de 2012 no se detectó ningún tipo de cianotoxina, habiendo sido muy escasa la presencia de cianobacterias en este último mes, cuando diatomeas del género *Melosira* sp., fueron dominantes.

En cuanto a los grupos de productos naturales analizados en el tamizaje fitoquímico de la biomasa de *L. robusta* obtenida en el laboratorio, fueron detectadas cuatro saponinas con valores de R_f de 0.12 (café-rojo), 0.16 (azul-verde),

0.39 (azul-verde) y 0.91 (café-rojo), siendo el valor de Rf del estándar de diosgenina de 0.18 (azul-verde). Se detectaron tres flavonoides con valores de Rf de 0.47 (violeta), 0.65 (azul) y 0.95 (rojo), siendo los valores de Rf de los estándares de 0.44 (amarillo) para rutina, 0.52

(azul) para ácido clorogénico y 0.84 (amarillo) para quercetina. En el caso de las antraquinonas, se detectaron dos compuestos que presentaron valores de Rf de 0.86 (amarillo) y 0.97 (rojo), siendo el valor de Rf del estándar de antrona de 0.97 (celeste). No fueron detectados alcaloides.

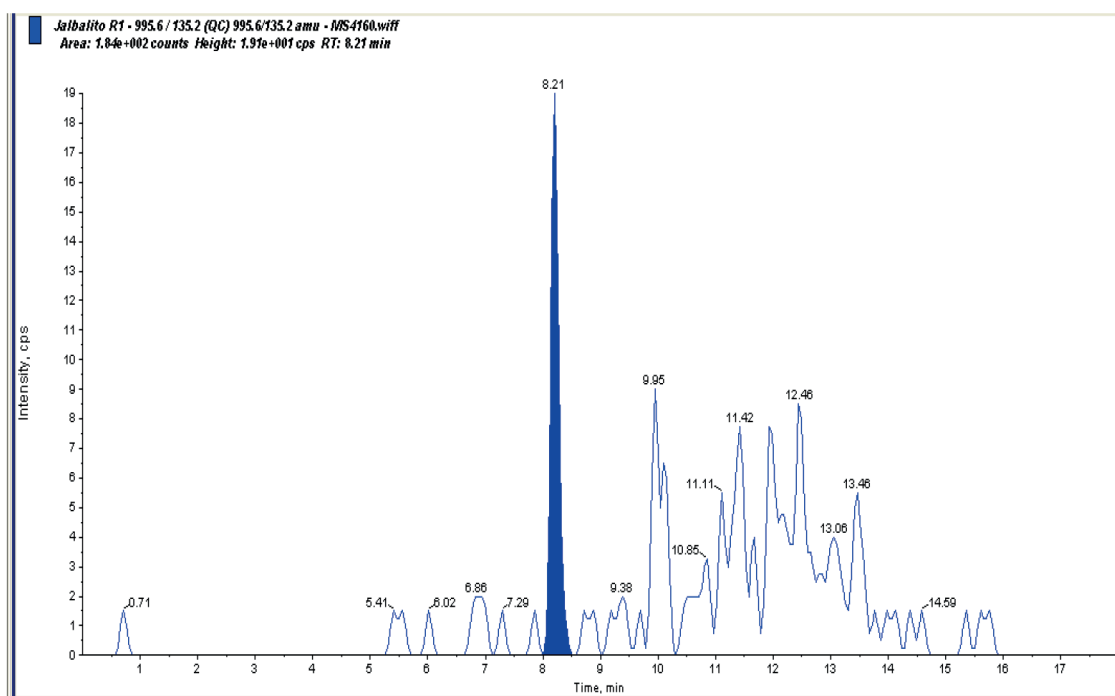


Figura 5. Cromatograma LC/MS de extracto de biomasa de fitoplancton colectada en octubre de 2012 en Jaibalito, lago de Atitlán. Sombreado en azul puede apreciarse el pico cromatográfico correspondiente a la microcistina-LR.

Discusión

Análisis de cianotoxinas en biomasa de fitoplancton del lago de Atitlán.

Fue encontrada la cianotoxina microcistina-LR, no así las microcistinas RR y YR más tóxicas, en muestras colectadas en octubre de 2012, en el centro del lago.

Octubre es el mes en que se han presentado los florecimientos más extensos de cianobacterias, siendo además *L. robusta* la cianobacteria más abundante en la biomasa colectada. Las microcistinas son un grupo de toxinas

hepatotóxicas cuya DL_{50} es de 60 mg/kg de peso corporal en ratas para las microcistinas YR y LR, y diez veces más elevada para la microcistina-RR (World Health Organization [WHO], 1999), presentando síntomas similares de envenenamiento en humanos (Carmichael, 1994), como dolor de estómago, náusea, vómitos, diarrea, dolores de cabeza y fiebre, por ingestión de agua contaminada con microcistinas, mientras que la inhalación de pequeñas gotas de agua conteniendo microcistinas puede causar irritación de ojos y nariz, tos, dolor de garganta, dolor de pecho, asma o reacciones alérgicas. La exposición a

cantidades elevadas de microcistinas puede causar daños en el hígado. Las hepatotoxinas llegan a los hepatocitos por medio de receptores de los ácidos biliares (Falconer, 1991) promoviendo la desorganización de los filamentos intermedios y de los filamentos de actina, que son polímeros proteicos componentes del citoesqueleto (Runnegar, & Falconer, 1986). La desorganización causada provoca una retracción de los hepatocitos, causando la pérdida de contacto entre estos y las células que forman los capilares sinusoidales (Lambert, Boland, Holmes, & Hrudey, 1994; Carmichael, 1994).

Los niveles de microcistina-LR encontrados en dos muestras de biomasa (20.9 ng/g peso seco en una muestra y en otra, no cuantificable), no se consideran de alto riesgo para la población, en vista que la concentración de la biomasa en el agua del lago ha sido de aproximadamente 10 mg/m³, correspondiendo a 0.21 ng de microcistina por 1 m³ de agua, mientras que el límite de exposición por ingesta diaria tolerable de por vida para humanos, para microcistina-LR, es de 0.04 mg/kg de peso corporal/día (WHO, 1999). Sin embargo es importante considerar que cuando ocurren floraciones, la densidad de biomasa se incrementa notoriamente, elevándose así también la concentración de las cianotoxinas que puedan producirse. Por ello, es recomendable realizar análisis de cianotoxinas durante los florecimientos que puedan ocurrir en el futuro. Otro aspecto importante de destacar de los resultados, es que no se detectaron cianotoxinas en la biomasa colectada en octubre de 2012 en el sitio ubicado en la bahía de Santiago Atitlán, en la cual la cianobacteria dominante era del género *Aphanizomenon*. De esta forma, es muy probable que *L. robusta* sea responsable por la producción de microcistina-LR en las muestras colectadas en el mismo mes, en los sitios localizados en el centro del lago y en Jaibalito,

donde dicha especie fue dominante. Esto indica que las cianobacterias pertenecientes a la población fitoplanctónica del lago de Atitlán son capaces de producir microcistina-LR durante las floraciones, debiéndose investigar las condiciones ambientales en que se produce la toxina. Por otra parte, las muestras de biomasa correspondientes a septiembre de 2011, no presentaron cilindrospermopsinas ni saxitoxinas, sin embargo, es recomendable analizar estas cianotoxinas en floraciones que puedan ocurrir en el futuro y que pudieran presentar composiciones diferentes en la población de cianobacterias.

Tamizaje fitoquímico

Las diferencias entre los valores Rf de las saponinas presentes en el extracto analizado así como del estándar, se deben a la diferencia en las estructuras químicas y en la polaridad de las saponinas presentes. En el análisis de flavonoides, el extracto de *L. robusta* presentó tres bandas de diferentes colores, bien definidas, así como una serie de bandas de diferentes colores que no se definieron bien, pero que coinciden ligeramente con el color y el valor Rf de los estándares rutina y quercetina, correspondiendo a la presencia positiva de flavonoides; así también de las tres bandas bien definidas observadas en la muestra, se puede prestar atención especial a la banda que presentó un valor de Rf de 0.65, ya que se puede comparar con la banda de color azul obtenida para el estándar de ácido clorogénico, que presentó un valor de Rf de 0.52, por lo que es probable que la estructura química de ese fenol sea similar a la del ácido clorogénico. De acuerdo a los resultados, se puede inferir que es posible que exista presencia de flavonoides en el extracto analizado, aunque por no presentarse la ruta biosintética del ácido shikímico en las cianobacterias, debería investigarse si los resultados positivos son causados por secuestro

de flavonoides del medio o por interferentes del revelador difenilboriloxietilamina (NP).

En la prueba de antraquinonas, se definió claramente una banda de color rojo intenso, con un Rf de 0.97, que es comparable con el estándar de antrona, banda color celeste, con un Rf de 0.97. Probablemente difieren en los colores debido a que son de estructuras químicamente diferentes, pero muy parecidas en polaridad. En cuanto al análisis de alcaloides, el extracto de *L. robusta* no presentó bandas color naranja o café en la región visible después de aplicar el reactivo derivatizante de Dragendorff, observándose únicamente bandas no definidas con un Rf cercano al estándar de papaverina y de un color no definido. Estas bandas no coinciden con las de los estándares, ya que el estándar de papaverina, sí presenta una banda color naranja con un Rf de 0.84 y el estándar de quinidina también presenta una banda color naranja con un Rf de 0.38, siendo así negativa la presencia de alcaloides. Anteriormente, Orjala y Werwick (1997) habían aislado y determinado la estructura molecular por medio de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) de dos alcaloides extraídos de la cianobacteria marina *L. majuscula*. Así, es posible que la producción de microcistinas por parte de *L. robusta*, se manifieste bajo ciertas condiciones ambientales no reproducidas en el cultivo de la cianobacteria en el laboratorio. Es también recomendable que se analicen las cianotoxinas en el agua del lago, al ocurrir floraciones, ya que en este estudio se analizaron solamente en la biomasa.

En síntesis, se logró aislar y cultivar *L. robusta* en el laboratorio, en recipientes cerrados herméticamente, con un fotoperiodo de 4 h., sin aireación. La cianobacteria *L. robusta* cultivada en el laboratorio presentó resultados positivos para saponinas, flavonoides y antraquinonas en el tamizaje fitoquímico, no habiendo presentado alcaloides. Investigaciones posteriores deberán

orientarse a la identificación y cuantificación de los metabolitos secundarios, así como al mejoramiento en el rendimiento de producción de *L. robusta* para establecer su potencial aplicación en la industria y la biotecnología.

Agradecimientos

A los departamentos de Físicoquímica, Química General y Laboratorio de Productos Naturales (Lipronat), de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia.

A la Universidad Federal de Río de Janeiro, Brasil, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Laboratorio de Ecofisiología y Toxicología de Cianobacterias, por la colaboración en el análisis de cianotoxinas.

A la Autoridad para el Manejo Sustentable del lago de Atitlán y su Entorno por su apoyo con personal y lancha, para la realización de los muestreos.

A la SENACYT, por el financiamiento parcial de la investigación, a través del Proyecto FODECYT 33-2010.

Referencias

- Abed, R.M.M., Dobretsov, S., & Sudesh, K. (2008). Applications of cyanobacteria in biotechnology. *Journal of Applied Microbiology*, 106(1), 1-12.
- Carmichael, W.W. (1994). The toxins of cyanobacteria. *Scientific American*, 270(1), 78-86.
- Falconer, I.R. (1991). Tumor Promotion and Liver Injury Caused by Oral Consumption of Cyanobacteria. *Environmental Toxicology and Water Quality*, 6(2), 177-184.

- Ferrão-Filho, A. da S., Soares, M.C.S., Freitas Magalhães, V., & Azevedo, S.M.F.O. (2009). Biomonitoring of cyanotoxins in two tropical reservoirs by cladoceran toxicity bioassays. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 72(2), 479-489.
- Jiménez, J.I., Vansach, T., Yoshida, W.Y., Sakamoto, B., Pörgzgen, P., & Horgen, D. (2009). Halogenated Fatty Acid Amides and Cyclic Depsipeptides from an Eastern Caribbean Collection of the Cyanobacterium *Lyngbya majuscula*. *Journal of Natural Products*, 72(9), 1573-1578.
- Harrison, P.J., & Berges, P.A. (2005). Marine culture media. In R.A. Andersen (Ed.), *Algal culturing techniques*. (pp. 21-34). Burlington, MA: Elsevier Academic Press.
- Hengfeng, M. & Tao, W. (2009). The mechanisms of ozonation on cyanobacteria and its toxins removal. *Separation and Purification Technology*, 66(1), 187-193.
- Komarek, J., Zapomelova, E., Smarda, J., Kopecky, J., Rejmankova, E., Woodhouse, J.,... Komarkova, J. (2013) Polyphasic evaluation of *Limnorphis robusta*, a water-bloom forming cyanobacterium from lake Atitlan, Guatemala, with a description of *Limnorphis* gen. nov. *Fottea, Olomouc*, 13(1), 39-52.
- Krishnamurthy, T., Carmichael, W.W., & Sarver, E.W. (1986) Toxic peptides from freshwater cyanobacteria (blue-green algae). Isolation, purification and characterization of peptides from *Microcystis aeruginosa* and *Anabaena flos-aquae*. *Toxicon*, 24(9), 865-873.
- La Bastille, A. (1988). *Lago de Atitlán*. Nueva York, NY: West of the Wind Publications.
- Laboratorio de investigación de productos naturales. (2005) *Manual de operaciones. tamizaje fitoquímico*. Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Laboratorio de investigación de productos naturales.
- Lambert, T.W., Boland, M.P., Holmes, C.E.B., & Hrudehy, S.E. (1994). Quantitation of the microcystin hepatotoxins in water at environmentally relevant concentrations with the protein phosphate bioassay. *Environmental Science and Technology*, 28(4), 753-755.
- Oliva, B., Pérez-Sabino, J. F., Del Cid, B., Martínez F. J., & Valladares, B. (2010). *Estudio de contaminantes ecotóxicos en agua y organismos acuáticos del Lago de Atitlán*. (Inf-2009-064). Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala, Dirección General de Investigación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia.
- Molica, R., Onodera, H., García, C., Rivas, M., Andrinolo, D., Nascimento, S.,... Lagos, N. (2002). Toxins in the freshwater cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanophyceae) isolated from Tabocas reservoir in Caruaru, Brazil, including demonstration of a new saxitoxin analogue. *Phycologia*, 41(6), 606-611.
- Orjala, J., & Gerwick, W. (1997). Two quinoline alkaloids from the Caribbean cyanobacterium *Lyngbya majuscula*. *Phytochemistry*, 45(5), 1080-1090.

- Osborne, N., Seawright, A., & Shaw, G. (2008). Dermal toxicology of *Lyngbya majuscula*, from Moreton Bay, Queensland, Australia. *Harmful Algae*, 7(5), 584-589.
- Oshima, Y. (1995). Post column derivatization liquid chromatography method for paralytic shell fish toxins. *Journal of AOAC International*, 78, 528-532.
- Pérez-Sabino, F., Valladares, B., Hernández, E., Oliva, B., Del Cid, M., & Jayes Reyes, P. (2015). Determinación de arsénico y mercurio en agua superficial del lago de Atitlán. *Ciencia, Tecnología y Salud*, 2(2), 37-44.
- Rejmankova, E., Komarek, J., Dix, M., Komarkova, J., & Girón, N. (2011). Cyanobacterial blooms in Lake Atitlán, Guatemala. *Limnologica*, 41, 296-302.
- Runnegar, M.T.C. & Falconer, I.R. (1986). Effects of toxins from the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* on ultrastructural morphology and actin polymerization in isolated hepatocytes. *Toxicon*, 24(2), 109-115.
- Smith, J.L., Boyer, G.L., & Zimba, P.V. (2008). A review of cyanobacterial odorous and bioactive metabolites: Impacts and management alternatives in aquaculture. *Aquaculture*, 280(1), 5-20.
- Sotero-Santos, R.B., Garcia Carvalho, E., Dellamano-Oliveira, & M.J., Rocha, O. (2008). Occurrence and toxicity of an *Anabaena* Bloom in a tropical reservoir (Southeast Brazil). *Harmful Algae*, 7(5), 590-598.
- World Health Organization. (1999) *Toxic Cyanobacteria in Water. A Guide to Public Health Consequence, Monitoring and Management*. Londres: E and FN Spon.